

Compositions de particules lipidiques solides monodisperses.

La présente invention concerne des compositions de particules lipidiques solides monodisperses comportant des principes actifs.

Les compositions de particules lipidiques solides sont particulièrement utiles pour la préparation de systèmes de délivrance pour l'administration d'un ou plusieurs principes actifs à l'homme et à l'animal ou la préparation de vaccins. L'administration peut avoir lieu notamment par les voies d'administration telles que la voie orale, voie intraveineuse, voie sous-cutanée, voie intramusculaire, voie nasale, voie pulmonaire, voie oculaire et la voie topique.

Selon le mode d'administration choisi, l'administration, notamment de principes actifs peu hydrosolubles et hydrosolubles, pose des problèmes particuliers.

Ainsi, dans le cadre de la voie orale, il est important d'assurer une bonne biodisponibilité, à savoir un pourcentage de principe actif absorbé, c'est à dire présent dans la circulation sanguine, suffisant et dont la variabilité chez un même individu, entre différentes prises, et d'un individu à l'autre est satisfaisante.

Molécules peu hydrosolubles. Pour être absorbée par voie orale, un principe actif doit d'abord être solubilisé ou dispersé dans les fluides digestifs et traverser ensuite l'épithélium intestinal.

On connaît des moyens de solubiliser ou de disperser des principes actifs en milieu aqueux, tels que l'incorporation dans des systèmes auto-émulsifiants, des micelles ou des liposomes. Cependant, ces procédés ne donnent pas entièrement satisfaction dans la mesure où les objets en suspension obtenus ne sont pas suffisamment stables au stockage et dans les fluides digestifs.

Les suspensions de particules lipidiques solides permettent de solubiliser et de disperser les substances actives. En effet, dispersés à chaud sous forme de gouttelettes, puis refroidis et solidifiés, ces matériaux peuvent encapsuler des principes actifs préalablement solubilisés ou dispersés dans le lipide fondu. La simplicité du procédé en a fait un concurrent sérieux des systèmes de polymères coprécipités en nanoparticules.

Récemment, des suspensions de nanoparticules lipidiques solides, aussi appelées « SLN » (solid lipid nanoparticles) ont été mises au point. Ce type de

système présente l'avantage (i) de pouvoir être fabriqué sans solvant, (ii) d'être biodégradable, (iii) exempt de résidus de synthèse toxiques (les SLN peuvent être préparés à partir d'excipients agréés pour la pharmacie), (iv) stable vis-à-vis de la coalescence

5 Les SLN sont stabilisées par la présence d'agents de surface. Cependant, la stabilité colloïdale en suspension lors du stockage et en cours de procédé de préparation ne peut être assurée au-delà d'une certaine concentration en phase dispersée, à savoir quelques pourcents en poids (2 à 5 %). Pour des concentrations plus élevées, il est difficile d'éviter l'agrégation des particules.

10 Ainsi, le document EP 0 605 497 décrit une suspension en phase aqueuse de particules lipidiques comprenant une substance active. Cependant, les particules obtenues selon ce document ne sont pas monodisperses. Or l'homogénéité de la répartition granulométrique des particules lipidiques solides dans le cadre de l'administration par voie orale est un paramètre important dans la mesure où la taille
15 des particules conditionne (i) la vitesse de libération du principe actif, (ii) les interactions avec la muqueuse gastro-intestinale (compte tenu de la surface développée élevée des petites particules et des propriétés de bioadhésion qui en résultent), (iii) la dégradation par les enzymes digestives, les lipases, qui est un phénomène de surface, (iv) le passage des particules à travers l'épithélium intestinal.
20 Les effets attendus de la microencapsulation sont (i) une amélioration de la solubilisation et/ou de la dispersion du principe actif, (ii) une protection contre la dégradation par les enzymes digestives et/ou les enzymes du métabolisme intestinal tels que les CYP3A4 (en particulier pour les substances actives d'origine naturelle), (iii) la possibilité de co-délivrer un inhibiteur des P-glycoprotéines, (iv) le cas échéant
25 une protection de la muqueuse gastro-intestinale lorsque les principes actifs sont irritants, (v) une augmentation du transport par voie lymphatique lorsque les constituants des particules promeuvent la production de lipoprotéines.

Les documents US 5,785,976 et US 5,885,486 au nom de Westensen *et al.* décrivent des suspensions de particules lipidiques solides.

30 Le document US 6,197,349 au nom de Westensen décrit un système d'administration de substances actives peu solubles au moyen de particules

surfondues appelées PSM (acronyme anglais pour « particles of supercooled melt ») et leurs suspensions. Ces particules contiennent hormis la substance active seulement des additifs pour réduire leur température de fusion ainsi que des stabilisants, notamment amphiphiles. Ils ne contiennent donc pas de lipides
5 proprement dits.

Le document US 6,207,178 au nom de Westensen décrit des suspensions de particules lipidiques cristallisées de forme anisotrope.

Principalement, deux procédés sont mis en œuvre pour fabriquer ces émulsions cristallisables : l'homogénéisation haute pression ou le mélange intensif,
10 éventuellement l'ultrasonication, à chaud, suivi d'un refroidissement. Dans les deux cas, les particules obtenues ont un diamètre largement inférieur au micron.

Molécules hydrosolubles. La faible biodisponibilité après administration par voie orale des molécules hydrosolubles est liée à leur faible diffusion à travers les membranes biologiques de l'épithélium intestinal. Les effets attendus de la
15 microencapsulation sont (i) une augmentation du temps de résidence devant la fenêtre d'absorption du tractus gastro-intestinal (liée aux propriétés bioadhésives des petites particules), (ii) une protection contre la dégradation par les enzymes digestives et/ou les enzymes du métabolisme intestinal tels que les CYP3A4 (en particulier pour les substances actives d'origine naturelle telles que les peptides, les
20 protéines, les acides nucléiques), (iii) la possibilité de co-délivrer un inhibiteur des P-glycoprotéines, (iv) une augmentation de la concentration locale de la molécule active à proximité de la membrane des cellules intestinales favorisant la diffusion, (v) le cas échéant une protection de la muqueuse gastro-intestinale lorsque les principes actifs sont irritants, (vi) une augmentation du transport par voie lymphatique lorsque les
25 constituants des particules promeuvent la production de lipoprotéines.

Une limitation du procédé de préparation des SLN pour les molécules hydrophiles tient à leur faible capacité d'encapsulation liée à la faible solubilité des molécules hydrophiles dans les huiles. Pour augmenter le taux de charge (pourcentage de principe actif dans les particules en masse), il est possible
30 d'encapsuler la molécule active en la solubilisant dans une phase aqueuse et en préparant initialement une émulsion double eau-dans-huile-dans-eau.

L'article de Garcia-Fuentes *et al.*, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 27 (2002), 159-168, décrit la préparation de particules lipidiques par émulsion double pour l'administration orale de protéines. Cependant le protocole met en œuvre une solution de tripalmitine (triglycéride) et de lécithine (phospholipides) dans le chlorure de méthylène. Il ne s'agit donc pas d'un procédé sans solvant.

Par ailleurs, l'émulsification par ultrasonication conduit à une calibration des particules dans une fourchette de taille restreinte à 0.15-0.5 μm . Enfin, l'agent de surface utilisé afin de leur conférer une meilleure stabilité dans les fluides digestifs est le PEG-stéarate.

Ces particules tendent cependant à présenter une aggrégation forte et rapide au stockage au-delà d'une concentration de 5% en poids.

Dans le cadre de la voie nasale, les effets attendus de la microencapsulation sont (i) une augmentation du temps de résidence devant la muqueuse nasale (liée aux propriétés bioadhésives des petites particules), (ii) une protection contre la dégradation par les enzymes, (iii) une augmentation de la concentration locale de la molécule active à proximité de la muqueuse nasale favorisant la diffusion. L'homogénéité de la répartition granulométrique des particules lipidiques solides dans le cadre de l'administration par voie nasale est un paramètre important dans la mesure où la taille des particules conditionne (i) la vitesse de libération du principe actif, (ii) les interactions avec la muqueuse nasale (compte tenu de la surface développée élevée des petites particules et des propriétés de bioadhésion qui en résultent), (iii) la biodégradation, (iv) le passage des particules à travers la muqueuse nasale. Toutefois, la fourchette de taille donnant les meilleurs résultats en termes de biodisponibilité et d'efficacité peut être décalée par rapport aux autres voies, en particulier la voie orale.

Dans le cadre de la voie pulmonaire, la répartition granulométrique des particules administrées est également importante. Pour atteindre les alvéoles pulmonaires, les molécules actives doivent être encapsulées dans des particules solides ayant des propriétés aérodynamiques particulières. Dans l'état actuel des connaissances, on sait qu'une distribution de taille centrée sur 3-5 μm permet une délivrance optimisée. De nombreux procédés ont été proposés pour préparer des

poudres dont les particules ont une distribution de taille resserrée autour de 3-5 μm : atomisation, précipitation dans un non solvant, technologies utilisant le dioxyde de carbone à l'état supercritique. Cette technologie présente une alternative pour produire de telles particules.

5 Dans le cadre de l'administration par voie sous-cutanée, des microparticules lipidiques peuvent être préparées dans le but de proposer une alternative au microsphères polymériques. Dans l'article de Reithemeier *et al.*, Journal of Controlled Release 73 (2001) 339-350, un peptide est encapsulé dans des particules de tripalmitine par un procédé de double émulsion. Cependant, ici encore, un solvant
10 organique est utilisé. L'homogénéité de la répartition granulométrique des particules lipidiques solides dans le cadre de l'administration par voie sous-cutanée est un paramètre important dans la mesure où la taille des particules conditionne (i) la vitesse de libération du principe actif, (ii) la vitesse de dégradation des particules et leur temps de séjour sous la peau, (iii) leur interaction avec le système immunitaire
15 (macrophages). Les contraintes sont pratiquement les mêmes pour la voie intramusculaire.

Dans le cadre de la voie intraveineuse, la taille des particules doit être inférieure au micron pour être compatible avec la circulation dans le flux sanguin.

Enfin, dans le cadre de la préparation de vaccins, la répartition de taille des
20 particules doit être adaptée à la destination souhaitée de l'antigène (cellules présentatrices d'antigènes) en fonction de la voie d'administration et de l'accessibilité aux cellules immunocompétentes.

L'invention a donc pour but de proposer un procédé de préparation de
25 particules lipidiques monodisperses comprenant au moins un principe actif ne présentant pas les inconvénients de l'art antérieur et qui soient appropriées notamment pour les voies d'administration indiquées ci-dessus.

Elle a également pour objet une composition utile pour la mise en œuvre de ce procédé.

30 Elle a enfin pour objet l'utilisation de ces compositions pour la préparation de systèmes de délivrance de principes actifs.

Selon l'invention, il est alors proposé une composition comprenant une phase lipidique monodisperse dispersée dans une phase aqueuse continue, dans laquelle la phase lipidique comprend au moins un lipide cristallisable, au moins un principe actif et au moins un composé stabilisant la phase dispersée comportant deux chaînes d'acides gras et une chaîne polyéthylène glycol.

Par « monodisperse », on entend une distribution granulométrique très étroite des gouttelettes ou globules dans la composition. On considère que la distribution est très étroite lorsque la polydispersité est inférieure ou égale à 40%, et de préférence de l'ordre de 5 à 30%, par exemple entre 15 et 25%. La polydispersité est alors définie comme étant le rapport de l'écart-type de la courbe à la médiane représentant la variation du volume occupé par la matière dispersée en fonction du diamètre des gouttelettes ou globules au diamètre moyen des gouttelettes ou globules.

On entend par « lipide solide » ou « lipide cristallisable », un lipide dont le point de fusion est supérieur à la température ambiante, et plus précisément des lipides ayant un point de fusion de 30 à 95°C et de préférence entre 35 et 75°C.

La composition selon l'invention est stable pendant le temps requis, et notamment celui nécessaire pour la récupération des particules sèches, par exemple par lyophilisation, à partir de celle-ci. On entend par « stable » le fait que les particules restent individualisées, non agrégées. Avantageusement, cette stabilité est conservée même lorsque la concentration en phase dispersée est élevée, notamment lorsqu'elle est supérieure à 5 % en poids.

La composition selon l'invention est avantageusement compatible avec la présence d'une teneur élevée en phase dispersée. De ce fait, elle permet de préparer des systèmes d'administration présentant une concentration élevée en principe actif. De tels systèmes d'administration ont pour avantage de limiter le volume ingéré, ce qui favorise l'acceptance de la part des patients.

La teneur en phase dispersée peut ainsi largement varier selon l'application visée. La composition selon l'invention peut ainsi comprendre notamment de 0,01 à 30 % en poids de phase lipidique.

Par ailleurs, le principe actif peut se partager entre la phase lipidique et la phase aqueuse au cours du procédé. Une teneur élevée en phase dispersée permet

de déplacer l'équilibre vers la phase lipidique et d'améliorer le rendement d'encapsulation.

La phase lipidique dispersée de la composition peut être monophasique ou comprendre en outre une deuxième phase aqueuse, dite interne, dispersée dans celle-ci.

Dans le premier cas, on est, à la température de fusion du lipide cristallisable, en présence d'une émulsion simple huile/eau. Après refroidissement jusqu'à solidification du lipide cristallisable, la phase lipidique dispersée se transforme en particules lipidiques solides.

Dans le deuxième cas, il s'agit à la température de fusion du lipide cristallisable d'une émulsion double eau/huile/eau. Une fois refroidie, on obtient à titre de phase dispersée des particules lipidiques solides présentant des cavités aqueuses ou vides (i.e. contenant de l'air ou un gaz).

Dans les deux cas, il est possible d'isoler la phase dispersée afin d'obtenir des particules lipidiques monodisperses contenant le ou les principes actifs.

Le diamètre moyen de la phase dispersée dans la composition selon l'invention est généralement compris entre 0,2 et 50 micromètres, de préférence entre 0,3 et 10 et tout particulièrement entre 1 et 6 micromètres.

La composition selon l'invention comprend à titre de stabilisant un composé stabilisant portant deux chaînes d'acides gras et une chaîne polyéthylène glycol.

A titre de stabilisant, l'utilisation d'esters d'acide gras du glycérol partiellement éthérifiés avec du polyéthylène glycol est particulièrement préférée. L'acide gras peut être notamment un acide mono ou dicarboxylique saturé ou non, linéaire ou ramifié comportant 8 à 24 atomes de carbone. De préférence, il s'agit d'un stéarate. Avantageusement, le stabilisant est un ester de polyéthylène glycol comprenant 25 à 1000 motifs, et en particulier 32 à 200 motifs de polyéthylène glycol.

De préférence, la composition comprend de 0,001% à 30%, de préférence de 1% à 10% en poids de stabilisant.

La phase aqueuse de la composition selon l'invention peut comprendre, le cas échéant, un épaississant. L'épaississement de la phase continue contribue à la stabilisation de l'émulsion. De tels épaississants peuvent avantageusement être des

sels d'acide alginique tels que l'alginate de sodium. L'épaississant peut être présent dans la composition à raison de 0,001 à 10 %, de préférence de 0,1% à 5% en poids, par rapport à l'ensemble de la phase aqueuse continue.

5 La phase continue aqueuse peut contenir en outre et comme par exemple le tréhalose, des électrolytes, tampons ou encore des conservateurs.

La phase aqueuse continue de la composition peut comprendre en outre d'autres agents tels que des agents assurant l'isotonicité du système, des cryoprotecteurs, des tampons ou encore des conservateurs.

10 Parmi les agents cryoprotecteurs, on peut citer notamment les polyols et les électrolytes. En particulier, conviennent par exemple la glycérine, le mannose, le glucose, le fructose, le xylose, le tréhalose, le mannitol, sorbitol, xylidine ou autres polyols tels que le polyéthylène glycol. A titre d'électrolyte, on peut citer le chlorure de sodium.

15 La phase lipidique dispersée de la composition selon l'invention comprend au moins un lipide cristallisable.

20 Parmi les lipides cristallisables conviennent notamment des mono-, di- ou triglycérides d'acides gras naturels ou synthétiques, les cires naturelles ou synthétiques, les alcools de cires et leurs esters, les alcools gras et leurs esters et éthers, les acides gras et leurs esters, les glycérides d'acides gras et les huiles végétales, animales hydrogénées, seuls ou en mélange.

Plus particulièrement, on peut citer les mono-, di- ou triglycérides d'acides gras saturés ou insaturés comportant 8 à 24 atomes de carbone, tels que le glycéride trimyrystate, le glycéride tripalmitate, le glycéride monostéarate, le cétylpalmitate et l'huile d'olive hydrogénée.

25 De tels lipides sont disponibles dans le commerce, notamment sous les dénominations suivantes : Suppocire® DM, Précirrol® ATO 5, Géléol®, Gélucire® 43/01, Gélucire® 62/05, Gélucire® 39/01, Gélucire® 50/02 (Gattefossé), Dynasan® 114, Dynasan® 116, Imwitor® 960K, Imwitor® 491, Imwitor® 900P, (Sasol), Oliwax® (QuimDis).

30 Le lipide solide de la phase dispersée a comme fonction de microencapsuler un principe actif non hydrosoluble (celui-ci peut être dissout ou dispersé dans le lipide

solide) ou un principe actif hydrosoluble (celui-ci peut être solubilisé dans la phase aqueuse interne de l'émulsion double ou dispersé dans le lipide).

Par ailleurs, il peut être avantageux que la phase lipidique comprenne au moins deux principes actifs.

5 Le ou les principes actifs peuvent être hydrosolubles ou peu hydrosoluble.

En effet, il est possible, dans le cas de compositions dont la phase dispersée comporte une phase aqueuse interne de véhiculer, seul ou en association avec les principes actifs peu hydrosolubles, des principes actifs hydrophiles.

10 Selon un mode de réalisation spécifique de l'invention, la phase lipidique comprend au moins un principe actif hydrosoluble et au moins un principe actif peu hydrosoluble.

Le principe actif peut être notamment un principe actif pharmaceutique, vétérinaire, phytosanitaire, cosmétique ou agroalimentaire. Par ailleurs, il peut être un détergent, un nutriment, un antigène ou un vaccin. De préférence, il s'agit d'un
15 principe actif pharmaceutique.

De préférence, le principe actif pharmaceutique est choisi parmi le groupe constitué par les antibiotiques, hypolipémiants, antihypertenseurs, agents antiviraux, bêtabloqueurs, bronchodilatateurs, cytostatiques, agents psychotropes, hormones, vasodilatateurs, anti-allergique, antalgique, antipyrétique,
20 antispasmodique, anti-inflammatoire, anti-angiogénique, antibactérien, anti-ulcéreux, antifongique, anti-parasitaire, antidiabétique, antiépileptique, antiparkinsonien, antimigraineux, anti-Alzheimer, antiacnéique, antiglaucomateux, antiasthmatique, neuroleptique, antidépresseur, anxiolytique, hypnotique, normothymique, sédatif, psychostimulant, anti-ostéoporose, anti-arthritique, anticoagulant, antipsoriasis,
25 hyperglycémisants, orexigène, anorexigène, antiasthénique, anti-constipation, anti-diarrhée, anti-traumatique, diurétique, myorelaxant, médicament de l'énurésie, médicament des troubles de l'érection, vitamines, peptides, protéines, anticancéreux, acides nucléiques, ARN, oligonucléotides, ribozymes, ADN.

Par ailleurs, il peut se révéler avantageux d'associer le ou les principes actifs
30 à un agent modulant l'absorption par voie orale ou un inhibiteur enzymatique, par exemple un inhibiteur de la P-glycoprotéine ou un inhibiteur de protéase.

Selon un autre aspect, l'invention concerne un procédé de préparation d'une composition comprenant une phase lipidique monodisperse dispersée dans une phase aqueuse continue, dans laquelle la phase lipidique comprend au moins un lipide cristallisable, au moins un principe actif, et un stabilisant, comprenant les

5 étapes consistant à :

- i. introduire dans le lipide cristallisable le ou les principes actifs;
 - ii. disperser la phase lipidique obtenue dans la phase aqueuse en présence d'un stabilisant, pour former une émulsion ;
 - iii. soumettre l'émulsion obtenue à un cisaillement pour former une
- 10 émulsion monodisperse.

Selon un autre aspect encore, l'invention concerne un procédé de préparation d'une composition comprenant une phase lipidique monodisperse dispersée dans une phase aqueuse continue, dans laquelle la phase lipidique comprend au moins

15 un lipide cristallisable, au moins un principe actif, un stabilisant et en outre une phase aqueuse dispersée, comprenant les étapes consistant à :

- i. disperser une solution aqueuse comprenant le ou les principes actifs dans le lipide à l'état fondu contenant le cas échéant un ou plusieurs principes actifs en présence d'un agent tensioactif lipophile;
 - ii. soumettre l'émulsion obtenue à un cisaillement afin de la rendre monodisperse ;
 - iii. incorporer l'émulsion monodisperse dans une phase aqueuse en présence d'un stabilisant pour former une émulsion double ;
 - iv. soumettre l'émulsion double obtenue à un cisaillement pour former une
- 20 émulsion double monodisperse.
- 25

Le cisaillement contrôlé permet de rendre les gouttelettes de phase dispersée monodisperses ; il permet cependant aussi de contrôler la taille des gouttelettes ou globules.

30 De préférence, le cisaillement contrôlé est réalisé en mettant l'émulsion en contact avec une surface solide en mouvement, le gradient de la vitesse

caractérisant l'écoulement de l'émulsion étant constant dans une direction perpendiculaire à la surface solide en mouvement. Un tel cisaillement peut être réalisé par exemple dans une cellule constituée de deux cylindres concentriques en rotation l'un par rapport à l'autre, telle qu'une cellule « Couette ». Dans ce type de cellule, le cisaillement est alors défini par le nombre de tours par minutes et l'espace entre les deux cylindres.

Pour les détails de ce procédé, il est renvoyé notamment aux demandes WO 97/38787, FR 2767064 et WO0185319.

L'émulsion obtenue peut être ensuite diluée à la concentration souhaitée.

L'un ou l'autre de ces procédés comprend en outre avantageusement une étape de refroidissement pour solidifier la phase lipidique dispersée.

Ainsi, selon un autre aspect, l'invention vise des particules lipidiques monodisperses comprenant un principe actif dissout ou dispersé dans un lipide cristallisable, susceptibles d'être obtenues par séparation de la phase aqueuse continue de la composition selon l'invention.

La phase aqueuse peut être éliminée selon l'un des moyens connus en tant que tels, comme par exemple la lyophilisation ou l'atomisation.

La composition selon l'invention donne alors accès à des particules lipidiques monodisperses et dont la taille est contrôlable.

Ainsi, la composition selon l'invention est particulièrement utile pour la préparation de systèmes de délivrance de principes actifs peu hydrosolubles et/ou hydrosolubles.

L'invention sera mieux comprise au regard des exemples suivants et des figures, qui montrent :

Fig. 1 le temps caractéristique en fonction de la vitesse de cisaillement pour la composition de l'exemple 5 ;

Fig. 2 : le temps caractéristique en fonction du logarithme de la vitesse de cisaillement pour la composition de l'exemple 6 et 7 diluée à 15% en poids de phase dispersée ;

Fig.3 : le logarithme du temps caractéristique en fonction de la vitesse

de cisaillement pour la composition de l'exemple 2 et 6, diluées à 15% en poids de phase dispersée ;

Fig.4 : l'évolution sur 30 jours de la distribution granulométrique de la composition de l'exemple 6;

5 Fig. 5 l'évolution sur 30 jours de la distribution granulométrique de la composition de l'exemple 7;

EXEMPLES

10 Il est entendu que les émulsions auxquelles il est fait référence dans ce qui suit sont des compositions selon l'invention, le terme étant utilisé afin de mieux mettre en lumière les différentes phases présentes dans les compositions.

Les émulsions monodisperses ont été obtenues en préparant d'abord une émulsion inverse laquelle a été soumise à un traitement adapté pour la rendre monodisperse. L'émulsion inverse a été ensuite introduite dans une phase aqueuse
15 externe pour former une émulsion double.

Les émulsions simples ont été obtenues par simple émulsification de la phase grasse dans la phase aqueuse.

Exemple 1

20 Préparation d'une émulsion inverse

Dans un récipient maintenu à 65°C au bain-marie, on a mélangé 9,9 grammes de PEG-30 dipolyhydroxystéarate (30 motifs de polyéthylène glycol, Arlacel P135 de chez UNIQUEMA) et 20,1 g de cire (Suppocire ® DM de chez Gattefossé, un mélange de glycérides d'acides gras saturés de C₈ à C₁₈ ayant un
25 point de fusion de 42 à 46°C). Dans cette phase grasse a été dispersé 70 g d'une solution aqueuse de NaCl (0,6 g/l, 0,4M) préalablement chauffée à 65°C. L'émulsion obtenue, de type eau dans huile, présentait 70% en poids de phase dispersée.

L'émulsion obtenue a été ensuite introduite dans un dispositif "Couette" chauffé à 65°C et soumis à un cisaillement défini par une vitesse de rotation à 400
30 tours/min pour un débit d'injection de 7 ml/min correspondant à une vitesse d'injection à 0,7.

L'émulsion obtenue était calibrée avec une taille moyenne de la phase dispersée de 400 nanomètres et a été conservée dans une étuve à 70°C.

Exemple 2

Emulsion double

40 g de l'émulsion inverse calibrée obtenue à l'exemple 1 ont été dilués dans 60 g de cire (Suppocire ® DM, mélange de glycéride d'acide gras saturé de C₈ à C₁₈) préalablement chauffée à 60°C.

6 g de l'émulsion inverse calibrée diluée ainsi obtenue ont été ensuite incorporés, toujours à 65°C, dans 4 g d'une phase aqueuse composée d'eau et de 8% d'un stabilisant (Gélucire ® 4414, de chez Gattefossé, mélange défini de mono-, di-, tri-glycérides et de mono-, di- et triesters de polyéthylène glycol et d'acides gras), 11,5% de glucose et 0,5% d'alginate de sodium HM120L, de chez **ALDRICH**) pour former une émulsion double. Ce pré-mélange contenait 60% en poids de phase dispersée.

Le pré-mélange a été soumis à un cisaillement dans un dispositif "Couette" de 150 tours/min pour une vitesse d'injection de 0,7 à une température de 65°C. L'émulsion obtenue était calibrée avec un diamètre moyen de la phase dispersée centré autour de 4µm.

Après émulsification, l'émulsion peut être diluée à chaud dans une solution aqueuse contenant 11,5% de glucose à la teneur désirée en phase lipidique. Après dilution, l'émulsion était conservée à 5°C.

Exemple 3

Emulsion double

L'émulsion inverse obtenue à l'Exemple 1 a été incorporée après dilution comme à l'exemple 2 dans une phase aqueuse contenant seulement 5% de stabilisant (Gélucire ® 4414) et 0,2% d'alginate de sodium.

Le pré-mélange obtenu comme à l'exemple 2 a été ensuite cisailé dans un

dispositif "Couette" à 75 tours/min à une vitesse d'injection de 0,7. L'émulsion double obtenue était calibrée la taille moyenne de la phase dispersée étant de 6,86µm.

Exemple 4

5 Emulsion double

On a préparé une émulsion double comme à l'exemple 2 sauf que la phase aqueuse contenait à titre de stabilisant 4% de PEG-150 distearate (Stepan ® PEG6000 DS de chez STEPAN) et 11,5% de glucose.

10 Le pré-mélange a été cisailé à 200 tours/min à une vitesse d'injection de 0,7 pour aboutir à une émulsion double dont la phase dispersée a un diamètre moyen centré autour de 4 µm.

Exemple 5

Emulsion simple

15 5-1 On a incorporé 6g de cire chauffé dans un bain-marie à 60°C (Suppocire ® DM, mélange de glycérides d'acides gras saturés de C₈ à C₁₈) dans 4 g de solution aqueuse contenant 8% en poids de stabilisant (Gélucire ® 4414).

20 Le pré-mélange a été ensuite cisailé dans un dispositif "Couette" à 600 tours/min à une vitesse d'injection de 0,7 pour aboutir à une émulsion simple dont le diamètre moyen est centré sur 1µm.

5-2 On a incorporé 6g de cire (Suppocire ® DM, mélange de glycérides d'acides gras saturés de C₈ à C₁₈) dans 4 g de solution aqueuse contenant 8% en poids de stabilisant (Gélucire ® 4414) et 0,5% d'Alginate de Sodium.

25 Le pré-mélange a été ensuite cisailé dans un dispositif "Couette" à 150 tours/min à une vitesse d'injection de 0,7 pour aboutir à une émulsion simple dont la phase dispersée a un diamètre moyen centré sur 6µm.

Exemple 6

Emulsion simple

30 On a incorporé 36,5g de cire (Suppocire ® DM, mélange de glycérides d'acides gras saturés de C₈ à C₁₈) dans 13,5 g de solution aqueuse contenant 14,5

% en poids de stabilisant (Gélucire ® 4414), 4,3 % en poids de tréhalose et 0,85 % en poids d'alginate de sodium comme à l'exemple précédent.

Le pré-mélange a été ensuite cisailé dans un dispositif "Couette" à 200 tours/min à une vitesse d'injection de 0,7 à 58°C pour aboutir à une émulsion simple dont la phase dispersée a un diamètre moyen centré sur 4,8 µm.

Exemple 7

Emulsion simple

On a incorporé 36,5g de cire (Suppocire ® DM, mélange de glycérides d'acides gras saturés de C₈ à C₁₈) dans 13,5 g de solution aqueuse contenant 6,6 % en poids de stabilisant (PEG-150 distéarate (Stepan ® PEG6000 DS de chez STEPAN) et 4,3 % de tréhalose comme à l'exemple 5.

Le pré-mélange a été ensuite cisailé dans un dispositif "Couette" à 200 tours/min à une vitesse d'injection de 0,7 à une température de 57°C pour aboutir à une émulsion simple dont la phase dispersée a un diamètre moyen centré sur 4,8 µm.

Stabilité des émulsions

Les émulsions préparées ont été caractérisées en termes de stabilité.

La stabilité des différentes formulations a été évaluée notamment au moyen d'études rhéologiques. L'écoulement contrôlé des émulsions a été étudié dans un rhéomètre à géométrie cône/plan (RS2, ADEMTEC) ayant les caractéristiques suivantes:

- Diamètre : 50mm,
- Angle du cône: 0,04 rad,
- Gap : 0,0453mm.

La température du rhéomètre est maintenue constante à 25°C.

Les émulsions ont été préparées la veille selon les exemples précédents, diluées à la fraction en phase lipidique désirée, puis aliquotées dans des piluliers de 5ml afin que chaque échantillon subisse le même processus avant l'étude rhéologique. Ces échantillons ont été stockés à 5°C.

Avant chaque mesure, le pilulier était légèrement agité (2 ou 3 renversements) puis l'émulsion était versée avec précaution sur le plan.

On constate une augmentation de la viscosité après un temps caractéristique pour chacune des émulsions étudiées. Cette augmentation de la viscosité s'accompagne de l'apparition de la texture crémeuse déjà remarquée après agitation manuelle. Le temps caractéristique retenu est celui correspondant à la viscosité maximale.

Au microscope, on observe également un changement de texture. La texture des émulsions est caractérisée par la présence de globules de taille sensiblement égale. Lors de l'augmentation de la viscosité, les globules s'agrègent pour former des clusters irréguliers et anisotropes de phase dispersée. Ce phénomène est irréversible. Il est supposé que ces clusters conditionnent le phénomène dit de "jamming" lors de l'écoulement.

Le temps caractéristique est dépend de la vitesse de cisaillement (Fig.1). En effet, on observe que pour une vitesse de cisaillement croissante le temps caractéristique diminue.

Le temps caractéristique suit une dépendance exponentielle du type dont le point τ est égal à $\tau_0 \times (E^{-1/\gamma_c})$ où $1/\gamma_c$ est le temps caractéristique du phénomène. Ainsi, lorsqu'on porte le logarithme du temps caractéristique en fonction de la vitesse de cisaillement, on obtient une courbe dont l'intercepte à cisaillement nul indique le temps de vie du matériau au repos, soit en condition de stockage sans cisaillement.

Cette courbe est montrée à la Figure 2 pour l'émulsion de l'exemple 5 et 6, respectivement diluées à 15% en poids de phase dispersée. Ces émulsions diffèrent principalement par la nature du stabilisant mis en œuvre.

On constate que le temps caractéristique est supérieur pour l'émulsion de l'exemple 6. Cette observation permet de conclure que la stabilisation de la phase dispersée par un composé à chaîne PEG longue (150 motifs de PEG) assure une meilleure stabilité de l'émulsion. Au contraire, l'émulsion stabilisée par un composé à chaîne PEG plus courte (32 motifs de PEG), présente un temps caractéristique et donc une stabilité inférieure.

Il s'avère en second lieu que le temps caractéristique d'une émulsion simple est

inférieur à celui d'une émulsion double comparable. La Figure 3 montre le temps caractéristique en fonction de la vitesse de cisaillement pour les émulsions de l'exemple 2 et 5, respectivement diluée à 15% de phase dispersée. Ces émulsions sont stabilisées avec le même composé. Les valeurs du temps caractéristique indiquent qu'une émulsion double est plus stable qu'une émulsion simple comparable. Ainsi, il semble la présence d'une phase aqueuse dispersée dans la phase lipidique dispersée de l'émulsion, stabilise l'émulsion et de ce fait allonge le temps de vie du système.

Dans un essai complémentaire, la stabilité de la distribution granulométrique des particules lipidiques dans la suspension a été observée.

L'analyse granulométrique a été réalisée au moyen d'un granulomètre laser MasterSizer S de chez MALVERN avec une cellule de 150 ml en supposant l'indice de réfraction de la phase dispersée correspondant à celle utilisée dans la présentation 3OJD.

Les figures 4 et 5 montrent ainsi les distributions granulométriques des émulsions de l'exemple 5 et 6 respectivement, dont le diamètre moyen des globules était centrée autour de 4 μm , mesurées à différents intervalles de temps. Entre les mesures, les émulsions, diluées à 5% de phase dispersée, étaient conservées à 5°C.

On constate que l'émulsion préparée avec un stabilisant présentant 150 motifs de PEG présente une stabilité encore supérieure à celle obtenue avec un stabilisant comportant 32 motifs de PEG.

Exemple 8

Elimination de la phase aqueuse de l'émulsion par lyophilisation :

Après émulsification, l'émulsion calibrée obtenue à l'exemple 2 à 7 diluée à chaud (typiquement 65°C) dans une solution aqueuse contenant 11,5% en poids de tréhalose et 0,25% en poids de hyaluronate de sodium, à hauteur de 5% en poids de phase lipidique.

L'émulsion est ensuite congelée et placée dans un lyophilisateur (Lyophilisateur Lyovac GT2 STERIS et cryostat Phoenix C75P THERMO HAAKE).

On obtient des particules lipidiques calibrées.

5 Les particules obtenues ne présentent pas d'agrégation lorsque observées en microscopie optique (redispersées dans une solution aqueuse contenant un tensioactif).

REVENDICATIONS

- 5 1. Composition comprenant une phase lipidique monodisperse dispersée dans une phase aqueuse continue, dans laquelle la phase lipidique comprend au moins un lipide cristallisable, au moins un principe actif et au moins un composé stabilisant la phase dispersée comportant deux chaînes d'acides gras et une chaîne polyéthylène glycol.
- 10 2. Composition selon la revendication 1, dans laquelle une phase aqueuse interne est dispersée dans la phase lipidique dispersée.
3. Composition selon la revendication 1 ou 2, dans laquelle la phase lipidique dispersée a un diamètre moyen compris entre 0,3 et 10 micromètres.
- 15 4. Composition selon l'une des revendications 1 à 3, comprenant 0,01 à 30 % en poids de phase lipidique.
5. Composition selon l'une des revendications 1 à 4, comprenant 0,001 à 30 % en poids de composé stabilisant la phase dispersée.
- 20 6. Composition selon l'une des revendications 1 à 5, dans laquelle la chaîne de polyéthylène glycol comprend 25 à 1000 motifs d'éthylène glycol.
- 25 7. Composition selon l'une des revendications 1 à 6, dans laquelle la phase aqueuse continue comprend en outre 0,001 à 10 % en poids d'un épaississant.
8. Composition selon la revendication 7, dans laquelle l'épaississant est un sel d'acide alginique.

9. Composition selon l'une des revendications 1 à 8, dans laquelle le lipide cristallisable est choisi parmi les mono-, di- ou triglycérides d'acides gras naturels ou synthétiques, les cires naturelles ou synthétiques, les alcools de cires et leurs esters, les alcools gras et leurs esters et éthers, les acides gras et leurs esters, les glycérides d'acides gras et les huiles végétales ou animales hydrogénées, seuls ou en mélange.
10. Composition selon la revendication 9, dans laquelle le lipide cristallisable est un mono-, di- ou triglycéride en C12-C18.
11. Composition selon l'une des revendications 1 à 10, dans laquelle la phase aqueuse continue comprend un agent cryoprotecteur.
12. Composition selon la revendication 11, dans laquelle l'agent cryoprotecteur est un polyol ou un sel.
13. Composition selon l'une des revendications 1 à 12, dans laquelle la phase lipidique comprend au moins deux principes actifs.
14. Composition selon l'une des revendications 1 à 13, dans laquelle la phase lipidique comprend au moins un principe actif hydrosoluble.
15. Composition selon l'une des revendications 1 à 14, dans laquelle la phase lipidique comprend au moins un principe actif peu hydrosoluble.
16. Composition selon l'une des revendications 1 à 15, dans laquelle la phase lipidique comprend au moins un principe actif hydrosoluble et au moins un principe actif peu hydrosoluble.
17. Composition selon l'une des revendications 1 à 16, dans laquelle le principe actif est choisi parmi le groupe des principes actifs

pharmaceutiques, vétérinaires, phytosanitaires, cosmétiques, agroalimentaires.

18. Composition selon l'une des revendications 1 à 17, dans laquelle le principe actif est un détergent, un nutriment, un antigène ou un vaccin.

19. Composition selon l'une des revendications 1 à 18, dans laquelle le principe actif pharmaceutique hydrosoluble est choisi parmi le groupe constitué par les antibiotiques, hypolipidémiants, antihypertenseurs, agents antiviraux, betabloqueurs, bronchodilatateurs, cytostatiques, agents psychotropes, hormones, vasodilatateurs, anti-allergique, antalgique, antipyrétique, antispasmodique, anti-inflammatoire, anti-angiogénique, antibactérien, anti-ulcéreux, antifongique, anti-parasitaire, antidiabétique, antiépileptique, antiparkinsonien, antimigraineux, anti-Alzheimer, antiacnéique, antiglaucomateux, antiasthmatique, neuroleptique, antidépresseur, anxiolytique, hypnotique, normothymique, sédatif, psychostimulant, anti-ostéoporose, anti-arthritique, anticoagulant, antipsoriasis, hyperglycémiant, orexigène, anorexigène, antiasthénique, anti-constipation, anti-diarrhée, anti-traumatique, diurétique, myorelaxant, médicament de l'énurésie, médicament des troubles de l'érection, vitamines, peptides, protéines, anticancéreux, acides nucléiques, ARN, oligonucléotides, ribozymes, ADN.

20. Composition selon l'une des revendications 1 à 19, dans laquelle le ou les principes actifs sont associés à un agent modulant l'absorption par voie orale ou un inhibiteur enzymatique.

21. Composition selon la revendication 20, dans laquelle l'inhibiteur enzymatique est un inhibiteur de la P-glycoprotéine ou un inhibiteur de protéase.

22. Procédé de préparation d'une composition comprenant une phase lipidique monodisperse dispersée dans une phase aqueuse continue, dans laquelle la phase lipidique comprend au moins un lipide cristallisable, au moins un principe actif, et un stabilisant, comprenant les étapes consistant à :

- i. introduire dans le lipide cristallisable le ou les principes actifs;
- ii. disperser la phase lipidique obtenue dans la phase aqueuse en présence d'un stabilisant, pour former une émulsion ;
- iii. soumettre l'émulsion obtenue à un cisaillement pour former une émulsion monodisperse.

23. Procédé de préparation d'une composition comprenant une phase lipidique monodisperse dispersée dans une phase aqueuse continue, dans laquelle la phase lipidique comprend au moins un lipide cristallisable, au moins un principe actif, un stabilisant et en outre une phase aqueuse dispersée, comprenant les étapes consistant à :

disperser une solution aqueuse comprenant le ou les principes actifs dans le lipide à l'état fondu contenant le cas échéant un ou plusieurs principes actifs en présence d'un agent tensioactif lipophile;

- i. soumettre l'émulsion obtenue à un cisaillement afin de la rendre monodisperse ;
- ii. incorporer l'émulsion monodisperse dans une phase aqueuse en présence d'un stabilisant pour former une émulsion double ;
- iii. soumettre l'émulsion double obtenue à un cisaillement pour former une émulsion double monodisperse.

24. Procédé selon l'une des revendications 22 ou 23, comprenant en outre une étape de refroidissement pour solidifier la phase lipidique dispersée.

25. Procédé de préparation de particules lipidiques monodisperses comprenant au moins un principe actif comprenant l'élimination de la phase aqueuse d'une composition préparée selon le procédé de l'une des revendications 22 à 24.

5

26. Procédé selon la revendication 25, dans lequel la phase aqueuse est éliminée par lyophilisation, si nécessaire après dilution de la composition dans une solution contenant un agent cryoprotecteur.

10

27. Utilisation des compositions selon l'une des revendications 1 à 21 ou des particules lipidiques monodisperses susceptibles d'être obtenues selon les procédés selon l'une des revendications 22 à 26 pour la préparation de systèmes de délivrance de principes actifs.

15

Fig. 1

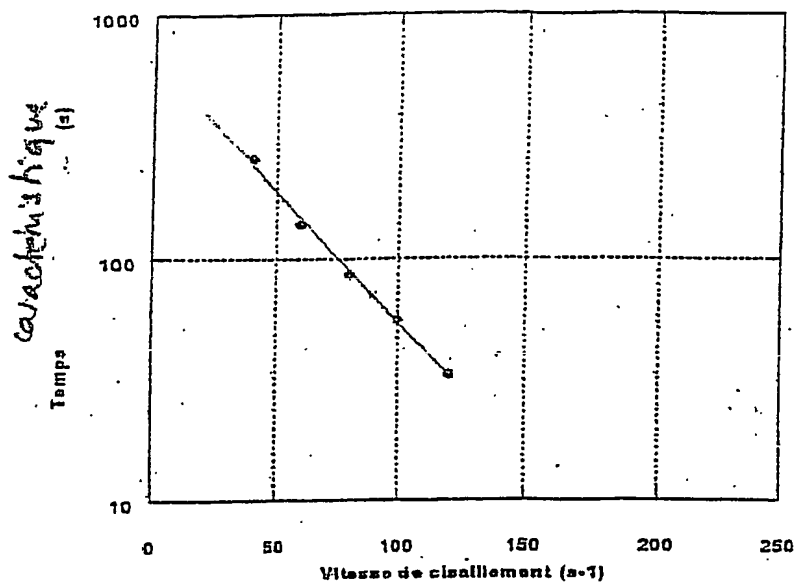
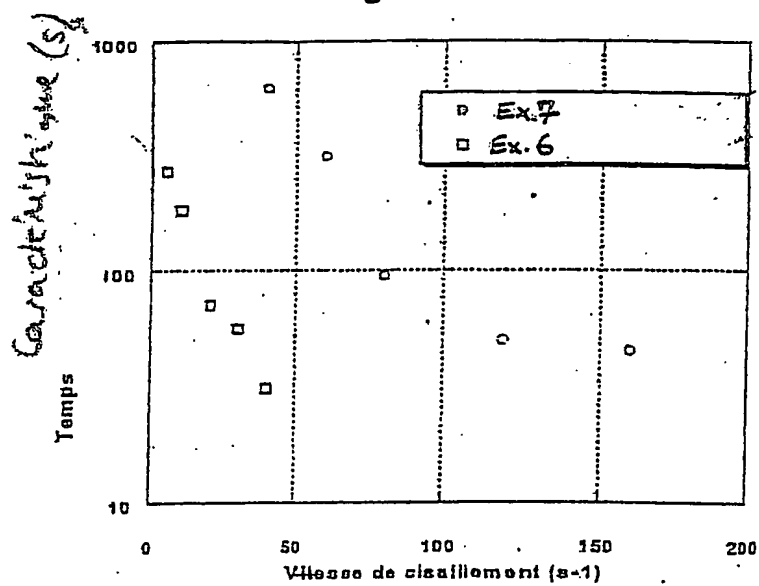


Fig. 2



2/3

Fig. 3

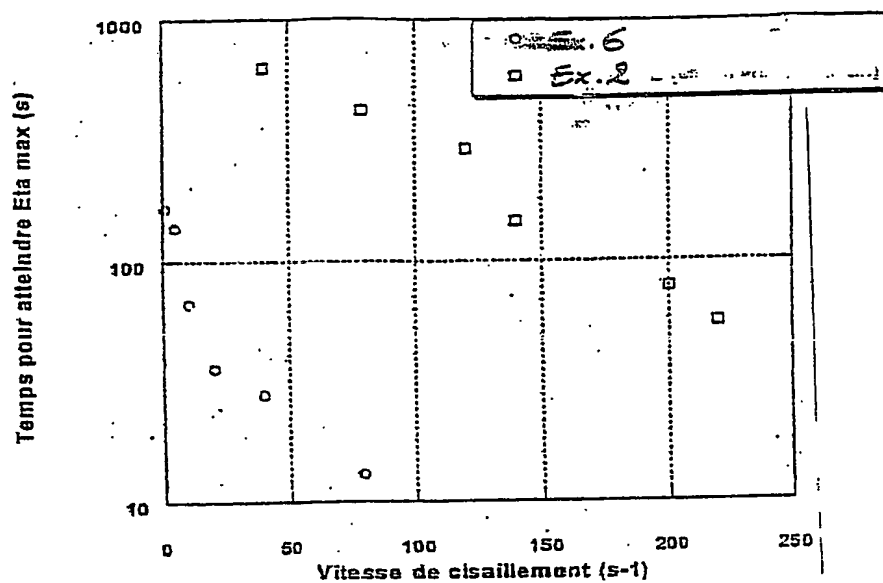


Fig. 4

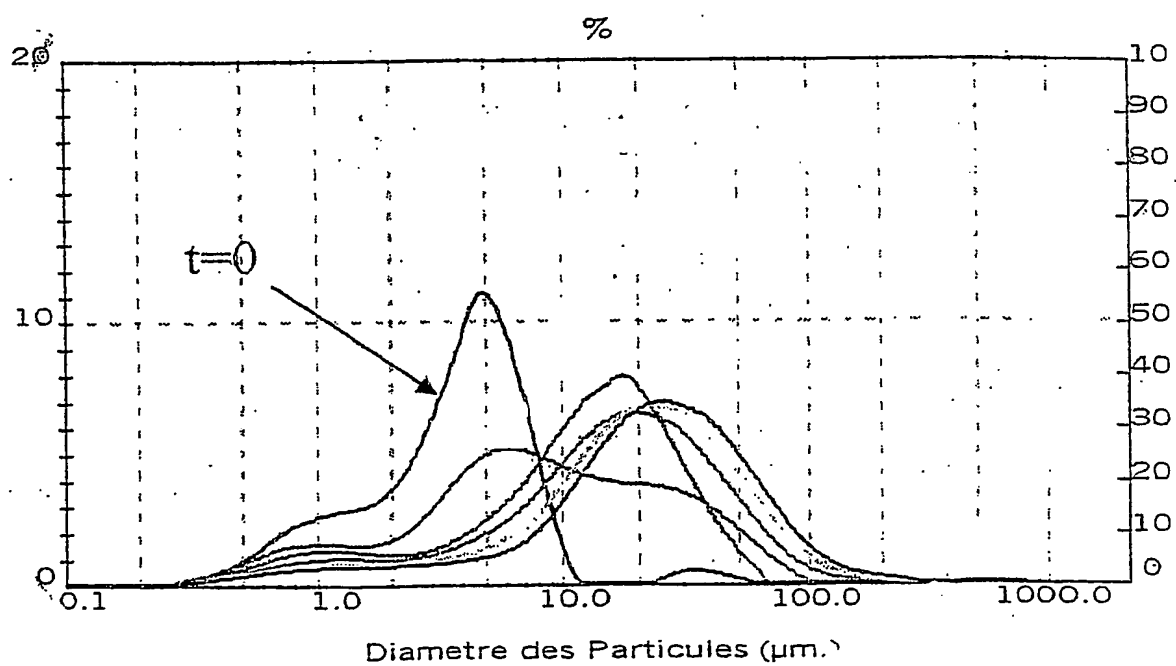
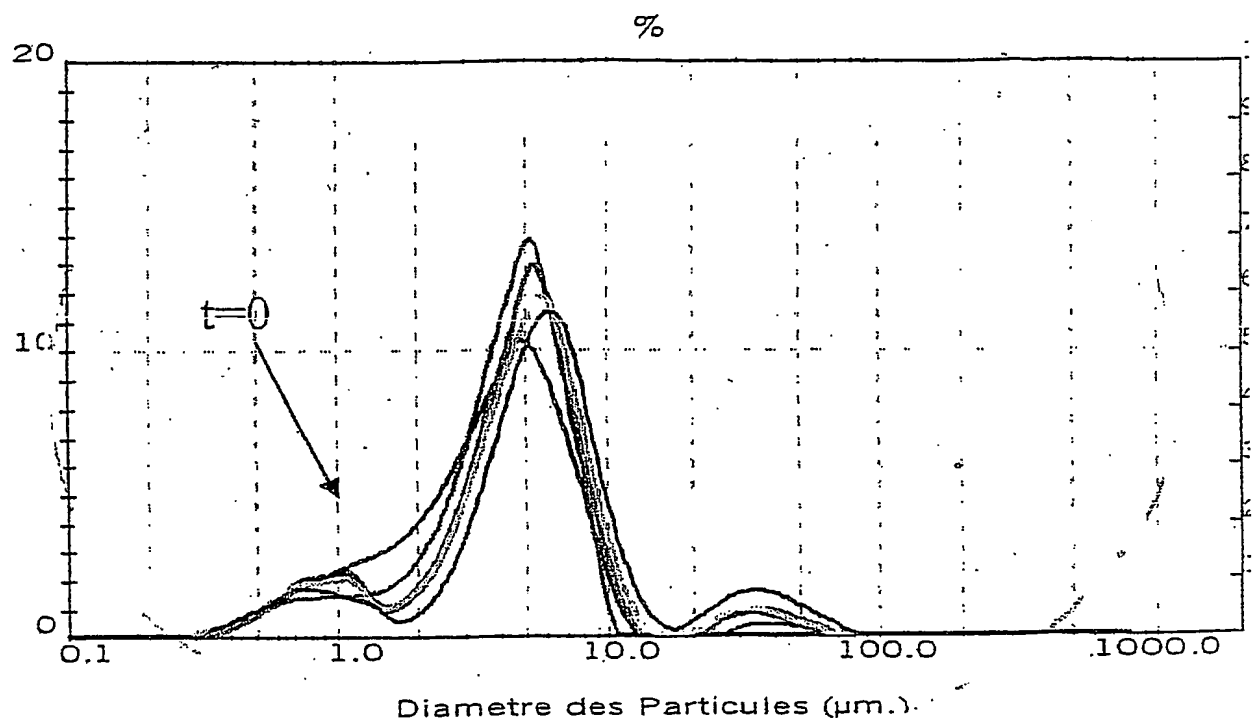


Fig. 5



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR2004/002480

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K9/113

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02/067899 A (AKZO NOBEL NV ; HERMKENS ERIK (NL); JANSEN THEODORUS (NL); SCHIJNS VIR) 6 September 2002 (2002-09-06) example 3	1-6,9, 10,14, 17-19, 22,24,27
X	DE 101 20 927 A (STOCKHAUSEN CHEM FAB GMBH) 31 October 2002 (2002-10-31)	1-6, 9-12,15, 17
Y	paragraph '0003! paragraph '0021! page 3, line 45 - line 60 claim 1	1-27
Y	WO 02/074260 A (SHISEIDO CO LTD ; TAKASU EMIKO (JP); NAKAMURA TADASHI (JP)) 26 September 2002 (2002-09-26) example 9 claim 1	1-27

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

4 February 2005

Date of mailing of the international search report

22/02/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Sindel, U

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR2004/002480

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 02067899	A	06-09-2002	BR 0207698 A	20-04-2004
			CA 2438692 A1	06-09-2002
			WO 02067899 A1	06-09-2002
			EP 1367997 A1	10-12-2003
			JP 2004523551 T	05-08-2004
			MX PA03007766 A	16-03-2004
			US 2004071716 A1	15-04-2004
DE 10120927	A	31-10-2002	DE 10120927 A1	31-10-2002
			CA 2445762 A1	07-11-2002
			WO 02087518 A2	07-11-2002
			EP 1427381 A2	16-06-2004
			US 2004170592 A1	02-09-2004
WO 02074260	A	26-09-2002	JP 2002275029 A	25-09-2002
			EP 1369101 A1	10-12-2003
			WO 02074260 A1	26-09-2002
			US 2004137019 A1	15-07-2004

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR2004/002480

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 A61K9/113

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 7 A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)
EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 02/067899 A (AKZO NOBEL NV ; HERMKENS ERIK (NL); JANSEN THEODORUS (NL); SCHIJNS VIR) 6 septembre 2002 (2002-09-06) exemple 3	1-6, 9, 10, 14, 17-19, 22, 24, 27
X	DE 101 20 927 A (STOCKHAUSEN CHEM FAB GMBH) 31 octobre 2002 (2002-10-31)	1-6, 9-12, 15, 17
Y	alinéa '0003! alinéa '0021! page 3, ligne 45 - ligne 60 revendication 1	1-27
Y	WO 02/074260 A (SHISEIDO CO LTD ; TAKASU EMIKO (JP); NAKAMURA TADASHI (JP)) 26 septembre 2002 (2002-09-26) exemple 9 revendication 1	1-27

☐ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *Z* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

4 février 2005

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

22/02/2005

Norm et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Sindel, U

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR2004/002480

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 02067899	A	06-09-2002	BR 0207698 A	20-04-2004
			CA 2438692 A1	06-09-2002
			WO 02067899 A1	06-09-2002
			EP 1367997 A1	10-12-2003
			JP 2004523551 T	05-08-2004
			MX PA03007766 A	16-03-2004
			US 2004071716 A1	15-04-2004
DE 10120927	A	31-10-2002	DE 10120927 A1	31-10-2002
			CA 2445762 A1	07-11-2002
			WO 02087518 A2	07-11-2002
			EP 1427381 A2	16-06-2004
			US 2004170592 A1	02-09-2004
WO 02074260	A	26-09-2002	JP 2002275029 A	25-09-2002
			EP 1369101 A1	10-12-2003
			WO 02074260 A1	26-09-2002
			US 2004137019 A1	15-07-2004

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.